

Humaner monoklonaler Antikörper mit fettssenkender Wirkung

5 Die Erfindung betrifft ein aufgereinigtes Polypeptid (SAM-6.10) sowie dessen Verwendung in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fettssenkender Wirkung sowie zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Nierenerkrankungen.

10 Hintergrund der Erfindung

Bei einem an Überangebot an Cholesterin (Hyperlipoproteinämie) im Körper kommt es zur Verkalkung (arteriosklerotische Plaque) der Innenschichten der Gefäße und zu einer langsam fortschreitenden Verhärtung und Verdickung der Arterienwände. Im Extremfall droht
15 ein Verschluss des Gefäßes oder beim Aufbrechen der Plaque Thrombusbildung. Die Arteriosklerose ist mit ihren Folgeerkrankungen (koronare Herzkrankheiten, Herzinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheiten, Schlaganfall) noch immer die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Weit über die Hälfte aller für die medizinische Betreuung zur Verfügung stehenden finanziellen Mittel werden schätzungsweise für die Folgen der Arteriosklerose ausgegeben.
20 Um die Ursachen der Arteriosklerose zu klären, wurden verschiedene Theorien entwickelt, wobei die Lipidtheorie die meistbeachtete ist.

25

Allgemein läßt sich sagen: Je höher der LDL-Cholesteringehalt bzw. der Gehalt an oxidiertem LDL-Cholesterin im Blut, desto höher das Risiko, an einer Gefäßverkalkung beispielsweise mit der Folge eines Herzinfarktes zu erkranken. Übergewicht und Hypercholesterinämie

sind mit die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose.

Definitionen und Begriffe

5 Fette, wie z. B. Cholesterin, sind weder in Wasser noch in Blutflüssigkeit löslich. Um sie trotzdem in einzelne Körperregionen transportieren zu können, werden die Fette, sobald sie sich im Blut befinden, an bestimmte Eiweißkörper (Proteine) gebunden. Diese Verbindungen aus Lipiden (Fetten) und Proteinen (Eiweißen) werden als Lipoproteine bezeichnet.

Die „Lipoproteine“ des Plasmas sind hochmolekulare wasserlösliche Komplexe, die aus Lipiden (Cholesterin, Triglyceride, Phospholipide) und Apolipoproteinen bestehen. Das cholesterinhaltige Lipoprotein LDL-Cholesterin verursacht Arteriosklerose und wird auch das "böse" Cholesterin genannt, wobei die oxidierte Form des LDL-Cholesterins für den Körper noch gefährlicher ist.

20 „Cholesterin“ wird im Körper ubiquitär synthetisiert und ist ein wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen. Im Gegensatz zu den ebenfalls endogen synthetisierten Triglyceriden und Phospholipiden kann der Sterolring des Cholesterinmoleküls nicht mehr abgebaut werden; Cholesterin wird in der Leber zu Gallensäure umgewandelt oder unverändert über die Galle in den Darm ausgeschieden.

Im Plasma liegt Cholesterin zu 25-40% als freies (unverestertes) Cholesterin und zu 60-75% mit ungesättigten Fettsäuren verestert vor. Beide Formen zusammen werden als Gesamtcholesterin bezeichnet. Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit wird Cholesterin im Plasma als Komplex mit Apolipoproteinen transportiert. Im Blut

werden etwa 70 Prozent des Gesamt-Cholesterins mit Hilfe von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) transportiert.

5 „Triglyceride“ sind Ester von Glycerin mit drei Fettsäureresten. Analog zum Cholesterin werden auch die Triglyceride im Plasma aufgrund ihrer schweren Löslichkeit an Apolipoproteine gebunden transportiert.

10 „Lipoproteine“ werden in der Leber oder im Darm synthetisiert und transportieren im Blut fettlösliche Substanzen wie das Cholesterin.

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrer Dichte, man unterscheidet die fünf Dichteklassen: Chylomikronen, very low density lipoproteines (VDL), low density lipoproteines (LDL) und high density lipoproteines (HDL). Die Chylomikronen, deren physiologische Konzentration im Nüchternserum im Gegensatz zu jenen der anderen Lipoproteine sehr gering ist, sind Transportvehikel für exogene Glyceride. Die physiologische Verteilung der anderen Lipoproteine ist wie folgt: VLDL 10 %, LDL 70 % und HDL 20 %. VLDL sind die Vorläufer der LDL und Vehikel für den Transport von endogenen Glyceriden. LDL entstehen durch die Hydrolyse der VLDL. LDL und HDL sind beides Regulatoren der zellulären Cholesterinhomöostase, wobei HDL außerdem die Lipolyse (Spaltung von Triglyceriden in Glycerin und die freien Fettsäuren) regulieren. LDL haben einen Durchmesser von ca. 20 nm. HDL sind die kleinsten (7-10 nm) und eiweißreichsten Lipoproteinen. Neben nativem LDL (LDL) ist im Blutserum auch oxidiertes LDL (oxLDL) nachweisbar. oxLDL interagiert mit endogenen Plasmaproteinen, insbesondere Glycoproteinen, durch spezifische Liganden und bildet oxLDL-Glykoprotein-Komplexe.

30

„Apolipoproteine“ sind ein Bestandteil der Lipoproteine und umgeben, zusammen mit polaren Lipiden, als eine Art äußere Schale den aus hydrophoben Lipiden aufgebauten Lipoprotein-Kern. Mit Ausnahme von LDL, welches nur Apoprotein B enthält, weisen die einzelnen Lipoproteinklassen mehrere strukturell verschiedene Apolipoproteinklassen auf.

Lipoprotein-Transport

Cholesterin wird hauptsächlich durch die beiden Lipoproteinklassen LDL und HDL transportiert. LDL sind vor allem zuständig für den Cholesterintransport zu peripheren Zellen, die spezifische Rezeptoren für die LDL besitzen. Die HDL ermöglichen und beschleunigen den Abtransport von Cholesterin aus den extrahepatischen Zellen und Gefäßwänden und führen es der Leber zu.

15

Pathogenität

Hinsichtlich der Pathogenität bei Lipidstoffwechselstörungen läßt sich allgemein sagen, dass LDL-Cholesterinerhöhungen in Verbindung mit HDL-Cholesterinverminderungen die ausgeprägteste Risikoerhöhung für Arteriosklerose darstellen. In der Pathogenese spielen LDL, deren Partikel wesentlich zur Bildung atherosklerotischer Plaques beitragen, und HDL daher eine gegensätzliche Rolle. Für die Beurteilung des Infarktrisikos sind die Quotienten aus Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin und insbesondere LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin entscheidend. (Auf die schützende Wirkung des HDL-Cholesterins weisen auch epidemiologische Studien (Framingham-Studie) hin.) Die Folgeerkrankungen der Arteriosklerose beinhalten neben der koronaren Herzkrankheit und peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten insbesondere Infarkte in Herz und Gehirn (Schlaganfall).

30

Vermutlich verursacht oxLDL genauso wie LDL arteriosklerotische Plaques, wobei für den Körper von oxLDL die größere Gefahr ausgeht.

- 5 Aber auch bei anderen Erkrankungen scheint oxLDL eine wichtige Rolle zu spielen. Bei Patienten mit chronischem Nierenversagen und Diabetes ist die Konzentration an oxLDL-Glykoprotein-Komplexen höher als bei gesunden Patienten.
- 10 LDL wird durch die Leber und durch Makrophagen aus dem Blutkreislauf entfernt. Makrophagen sind Zellen des Fremdkörperabwehrsystems, die zur Phagozytose größerer Partikel fähig sind.
- 15 Der „Scavenger-Pathway“ ist ein bekanntes Modell zur Erklärung der Aufnahme von Partikeln durch Zellen (Phagozytose). Die Aufnahme fester Partikel (Gewebestrümmer, Fremdkörper, Bakterien oder LDL-Plaques) in das Zellinnere von Phagozyten mit nachfolgendem intrazellulären Abbau erfolgt durch Phagozytose. Die zu Phagozytose befähigten Zellen werden auch als Fresszellen bezeichnet und bestehen überwiegend aus Gewebsmakrophagen sowie aus mobilen Blutmonozyten.
- 20 Bei der „Phagozytose“ kommt es nach Anlagerung der Partikel an die Zellmembranen der Phagozyten durch Bindung an membranständige Fc- und Komplementrezeptoren zur Aktivierung kontraktile Strukturen innerhalb des Zytoplasmas. Durch lokale Einstülpungen der Zellmembranen kommt es zum Einschluss der Partikel in Zytoplasmavakuolen.
- 25 Bei der „Phagozytose“ kommt es nach Anlagerung der Partikel an die Zellmembranen der Phagozyten durch Bindung an membranständige Fc- und Komplementrezeptoren zur Aktivierung kontraktile Strukturen innerhalb des Zytoplasmas. Durch lokale Einstülpungen der Zellmembranen kommt es zum Einschluss der Partikel in Zytoplasmavakuolen.
- 30 Die sog. Abräum-(Scavenger-)Phagozyten findet man im Lymphknoten in und entlang der zur Medulla (Mark) gehörenden Faserstränge.

Während der Lymphpassage vom afferenten zum efferenten Ende des Lymphknotens werden partikuläre Antigene durch die zur Phagozytose befähigten Zellen entfernt.

- 5 Darüberhinaus ist bekannt, dass die Adhärenz an phagozytierende Zellen, wie polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen, durch die Anhaftung von Immunoglobulinen (Ig) an die Oberfläche von Bakterien (und anderen Antigenen) vergrößert ist. Es wird vermutet, dass die gesteigerte Adhärenz durch Anlagerung des Fc-Anteils des Immunoglobulins an die Fc-Rezeptoren der Phagozyten bewirkt wird.
- 10 Nach dem „Schmackhaftmachen der Antigene durch Anhaftung von (od Bindung von) Antikörpern“ wird der Komplex aus Antigen und Antikörpern von den phagozytierenden Zellen schneller aufgenommen und verdaut. Die Beschichtung der Antikörperoberfläche mit
- 15 Immunoglobulinen wird auch als opsonin-bedingte (Fc) Adhärenz bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr.

- Die an die Oberfläche von Bakterienzellen bindenden Antikörper sind in der Lage, bestimmte Komponenten der extrazellulären Flüssigkeiten zu fixieren. Im Überbegriff werden diese Komponenten als „Komplement“ bezeichnet. Tierversuche zeigten, dass die Phagozytose von mit Antikörpern beschichteten Zellen bei jenen Tieren mit Komplementmangel verzögert ist. Somit liegt nahe, dass es bei der Opsonierung einen Synergismus zwischen Antikörpern und Komplement gibt.
- 20
- 25

Beschreibung der Erfindung

Die Wirkung der aus dem Stand der Technik bekannten Arzneimittel zur Senkung des LDL-Cholesterins beruht auf der Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese (CSE). Als Cholesterinsynthesehemmer ist beispielsweise eine unter dem Handelsnamen Lipobay vermarktet Substanz bekannt geworden. Die Nebenwirkungen der CSE-Hemmer allgemein sind erheblich und schließen u.a. gastrointestinale Störungen, Schlafstörungen, Schwindel, Sehstörungen, allergische Reaktionen und Haarausfall ein. Lediglich im Versuchsstadium, und zwar nur bei schwerer familiärer Hypercholesterinämie, ist ein Ansatz der somatischen Gentherapie, der die Übertragung des Gens für den LDL-Rezeptor auf autologe Leberzellen zum Inhalt hat.

Ein weitgehend nebenwirkungsfreier Stoff, der als Fettsenker wirkt, ist bislang nicht auf dem Markt. Insbesondere sind Antikörper, die eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von Lipoproteinen induzieren, bislang nicht bekannt. Obwohl die schädigende Rolle von Lipoproteinen bei Nierenerkrankungen (Lipid-induzierte Schädigung von Zellen des Glomerulus-Filtrations-Apparates der Niere) bekannt ist, gibt es noch keinen auf Antikörper basierenden Therapie-Ansatz von Nieren Erkrankungen, insbesondere der Glomerulonekrose.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Generierung eines neuen Stoffes bzw. einer neuen Stoffklasse zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verringerung des LDL-Cholesterins bzw. des oxLDL-Cholesterins bei Mensch und Tier mit dem vorteilhaften Ziel der Verringerung des Infarktrisikos.

Zur Lösung der Aufgabe wird ein Polypeptid vorgeschlagen, dessen

- dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3, und
- das low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidiertes LDL (oxLDL), insbesondere LDL-Cholesterin und/oder oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin), bindet.

Der Kern der Erfindung besteht in der überraschend gemachten Beobachtung, dass ein gereinigtes Polypeptid, dessen Sequenz ganz oder teilweise der leichten (V_L) oder schweren Kette (V_H) eines humanen monoklonalen Antikörpers (SAM-6.10) entspricht, die Senkung des low density lipoproteins (LDL) und/oder oxLDLs bewirkt. Die Entdeckung dieser Eigenschaft, die den Einsatz des Polypeptids in entsprechender pharmazeutischer Formulierung als Fettsenker nahelegt, wurde im Rahmen der biochemischen Charakterisierung des Polypeptids gemacht. Vorteilhafterweise ist die Bindung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder der Fragmente des Polypeptids an LDL und/oder oxLDL und an VLDL, den Vorläufern der LDL, stärker ist als die Bindung an HDL. Aufgrund dieser Eigenschaft führt das erfindungsgemäße Polypeptid zu einem geringen Wert für den jeweiligen Quotienten aus LDL/HDL und/oder oxLDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

Die spezifische Bindung des Polypeptides an low density lipoproteins (LDL und/oder oxLDL), bzw. LDL-Cholesterin und/oder oxLDL-Cholesterin wurde experimentell durch die ELISA-Methode nachgewiesen. Im gleichen Experiment konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung des erfindungsgemäßen Stoffes an high density lipoproteins (HDL) schwach ist.

- Der erfindungsgemäße Antikörper umfasst die nach der gängigen Nomenklatur zur Beschreibung von Antikörper bezeichneten Gruppen V_L , V_H , F_v , F_c , Fab , Fab' , $F(ab')_2$. Die genannten Gruppen werden auch als Fragmente bezeichnet. Es ist durchaus möglich, dass
- 5 ein einzelnes Fragment Ursache für die fetttsenkende Wirkung des erfindungsgemäßen Polypeptids ist. In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Stoffes handelt es sich um einen human monoklonalen Antikörper.
- 10 Als „funktionelles Fragment“ im Sinne der Erfindung wird ein Polypeptid bezeichnet, dass zumindest eine der biologischen Aktivitäten besitzt, die auch das gesamte Polypeptid aufweist. Bei Antikörpern ist z. B. bekannt, dass für die spezifische Bindung nicht alle CDR-Regionen erforderlich sind. D.h. die spezifische Bindung des Antikör-
- 15 pers kann z. B. durch nur eine CD-Region bewerkstelligt werden, obwohl insgesamt 3 CD-Regionen vorhanden sind. Die spezifische Bindung des Antikörpers an ein Antigen kann z.B. zur Induktion von Apoptose oder zur Inhibition der Zellproliferation führen. Die biologische Aktivität eines funktionellen Fragmentes kann durch verschie-
- 20 dene, dem Fachmann bekannte Methoden, gemessen werden. Eine Methode zur Messung der Interaktion zwischen Antikörpern und LDL, insbesondere LDL-Cholesterin, ist die ELISA-Methode.
- 25 Die complementarity-determining regions (CDRs) der Polypeptidsequenz beinhaltet die Aminosäuresequenz, die im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1), Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) und Gln-Ala-TrpAsp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) der SEQ ID NO 1 der variablen Region der leichten Kette (V_L); siehe auch Figur 2.
- 30

Die complementarity-determining regions (CDRs) der Peptidsequenz beinhalten Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen identisch sind mit Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1), Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) und Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) der SEQ ID NO 3 der variablen Region leichten Kette (V_H); siehe auch Figur 4.

Als „im wesentlichen identisch“ wird ein Polypeptid oder eine Nukleinsäuresequenz bezeichnet, die zumindest 75 %, 80 %, 85 %, oder 90 % mit der als Referenz angegebenen Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 1 und 3) oder mit der Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NO: 2 und 4) aufweist. In einer Weiterbildung des Polypeptids bzw. der Nukleinsäuresequenz sind mindestens 95 %, 98 %, 99 % oder 100 % Identität im Vergleich zu den angegebenen Referenzen nachweisbar. Für Polypeptide wird die Länge des Vergleichsabschnitts im allgemeinen mindestens 5, 10, 15 oder wünschenswerterweise mindestens 20 oder 25 aufeinander folgende Aminosäuren aufweisen.

Das erfindungsgemäße Polypeptid ist generierbar durch ein Verfahren, das unter dem Namen Hybridoma-Technik (Köhler, Millstein, Nature, 1975, Vol. 256, 495) bekannt ist und die Isolation von monoklonalen Antikörpern ermöglicht. Es beruht auf der in vitro-Gewinnung von zellulären Hybriden die durch Zellfusion von normalen Lymphozyten mit unbegrenzt lebens- und teilungsfähigen Myelomzellen (z.B. HAB-1) gewonnen werden. Die hierbei erzeugten Hybridom-Zellen weisen Eigenschaften beider Elternzellen auf. Dem entsprechend besitzen sie die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper zu produzieren (z.B. SAM-6.10) und die Fähigkeit der Myelomzelle zur unbegrenzten Teilung und damit zur Produktion der Antikörper in großen Mengen. Jede aus der Fusion resultierende Hybridzelle stellt monoklonale Antikörper her deren Spezifität von der ursprünglichen

5 Lymphozytenzelle bestimmt wird. Die Hybridomzellen werden vermehrt und dann diejenigen selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Kultivierung dieser Auswahl und deren Isolierung führt zu hochspezifisch reagierenden Antikörpern, welche nur mit einer bestimmten antigenen Determinante reagieren.

10 Der Nachweis der deutlichen Senkung des low density lipoprotein (LDL)-Spiegels (bzw. des LDL-Cholesterin Spiegels) bzw. der jeweils oxidierten Form im Blutplasma wurde im Tierexperiment bestätigt, ohne dass sich der HDL-Spiegel im nachweisbaren Bereich senkt. Wesentlich dabei ist, dass die Vitalfunktionen der Tiere während der Gabe des Antikörpers nicht beeinträchtigt werden, so dass die erfindungsgemäße Substanz bislang als Nebenwirkungsfrei bezeichnet werden kann. (Die Wirkungsweise des erfindungsgemäßen Antikörpers könnte sich in Analogie zum Mechanismus des bekannten Scavenger-Pathways erklären lassen.)

20 Eine weiteres Indikationsgebiet für den Einsatz des erfindungsgemäßen Medikamentes ist die Behandlung von Nierenerkrankungen, insbesondere die Glomerulonekrose (Glomerulosklerose).

25 Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass das erfindungsgemäße Polypeptid zur Herstellung des Arzneimittels bevorzugt in gereinigter Form eingesetzt wird, wobei zur Reinigung sämtliche dem Fachmann bekannten Verfahren (z.B. Affinitätschromatographie, Gelfiltration) in Frage kommen. Als Indikation des erfindungsgemäßen Stoffes steht des fett senkende Wirkung im Vordergrund, wobei insbesondere die selektive Senkung von LDL bzw. LDL-Cholesterin hervorzuheben ist.

30 Aufgrund der Eigenschaft LDL und/oder oxLDL stärker zu binden als HDL bewirkt das erfindungsgemäße Polypeptid einen geringen Wert

für den Quotienten aus LDL/HDL und/oder oxLDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

5

Die Hilfs- und Trägerstoffe zur Herstellung eines Arzneimittels sind dem Fachmann bekannt und können nach gängiger Praxis hergestellt werden (siehe Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

10

Material und Methoden

Immortalisierung von Lymphozyten und Primärtestung der Antikörper

5 Zur Immortalisierung werden die Lymphozyten mit dem Heteromyelom HAB-1 (Faller et al., 1990) nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert. Kurz zusammengefasst, Lymphozyten werden mit HAB-1 Zellen mittels PEG verschmolzen. Die Triome werden auf vier 24-Lochplatten ausgesät. Die durchschnittliche Wachstumsfrequenz beträgt 80-90%, 50% der wachsenden Klone sezernieren Immunglobuline. Die erste Austestung der sezernierten humanen monoklonalen Antikörper erfolgt im ELISA, um den Isotyp zu ermitteln. Nachfolgend können die humanen monoklonalen Antikörper immunhistochemisch, genetisch, biochemisch und molekularbiologisch analysiert werden.

Benötigte Medien:

- RPMI 1640 (Firma PAA) ohne Zusätze
- RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (HAT-Supplement, Firma PAA) sowie 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin
- HAB-1 (Fusionspartner) zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen
- zentrifugieren 5 min bei 1500U/min
- eingefrorene Lymphozyten (aus Milz, Lymphknoten oder Blut) auftauen und zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen, ebenfalls zentrifugieren
- beide Pellets jeweils in 10 ml RPMI ohne Zusatz aufnehmen und in der Neubauer-Zählkammer zählen
- im Verhältnis von 1:2 – 1:3, Hab-1 zu Lymphozyten, fusionieren
- die Zellpellets nach dem zweiten Waschvorgang zusammen geben, mischen und 8 min bei 1500 U/Min zentrifugieren
- das zuvor bei 37°C aufgewärmte PEG (Polyethylene Glycol 1500, Firma Roche) vorsichtig tröpfelweise auf das Pellet unter leicht rotierenden Bewegungen des 50 ml Röhrchens laufen lassen
- leicht resuspendieren und dann genau 90 sek. im Wasserbad bei 37°C rotieren lassen
- danach wird das PEG mit RPMI ohne Zusätze herausausgewaschen (zwei volle 10er Pipetten)

- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- 24 Well-Platten ausplattieren mit 1ml pro Well RPMI mit HAT-Zusatz (HAT= Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)
- das Pellet lösen in RPMI mit HAT-Zusatz
- 5 • jeweils einen halben ml der Zellen in ein 24 Well pipettieren
- Fusionsplatten in den Brutschrank stellen
- wöchentlich Mediumwechsel mit RPMI mit HAT-Zusatz

Reinigung des Antikörpers SAM-6.10

- 10 **Reinigung von Kulturüberstand durch Kationenaustauschchromatographie über FPLC**

- 15 Die den IgM-Antikörper SAM-6.10 produzierenden Hybridomzellen wurden hierzu in einem speziellen serumfreien Zellkulturmedium (AIMV-Medium, Gibco) herangezogen und der Gehalt an IgM im Kulturüberstand nephelometrisch bestimmt. Zur Aufreinigung wurde der Kulturüberstand auf einen pH-Wert von auf 5,9 eingestellt und die Lösung filtriert. Zur Bindung wurde eine spezielle Kationen-Säule (HiTrapTM SP FF column, 5 ml, Amersham Bioscience) verwendet.
- 20 Die Säule wurde zu Beginn der Reinigung mit filtriertem Puffer A (20 mM Phosphatpuffer, pH 5,9) äquilibriert. Anschließend wurde der auf Eis gekühlte Kulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde die Säule für 20 min und einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer A bis zu
- 25 einer Basislinienkonstanz gewaschen um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde der an die Säule gebundenen Antikörper durch Beimischung von Puffer B (20 mM Phosphatpuffer, 1M NaCl, pH 8,0) eluiert und in Fraktionen gesammelt. Der Gehalt an SAM-6.10 Antikörper (IgM) in den einzelnen Fraktionen
- 30 wurde im Folgenden nephelometrisch bestimmt und die Reinheit und Intaktheit des gereinigten Antikörpers über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse überprüft.

Messung von oxLDL

Die Messung erfolgt mit Hilfe des Test-Kits Oxidised LDL ELISA von der Firma Mercodia, Uppsala, Schweden. Test-Prinzip: Der ELISA für oxidiertes LDL ist ein enzymatischer, zweiseitiger Immunoassay mit einer Festphase. Er basiert auf der direkten Sandwich-Technik, bei der zwei monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen auf oxidiertem Apolipoprotein B ausgerichtet werden. Während der Inkubation reagiert oxidiertes LDL in der Probe mit anti-oxidiertem LDL-Antikörpern, die an die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte gebunden sind. Nach dem Waschen, wobei die nicht-reaktiven Bestandteile der Probe entfernt werden, erkennt ein peroxidase-konjugierter anti-human Apolipoprotein B Antikörper das an der festen Phase gebundene oxidierte LDL. Nach einer zweiten Inkubation und einem Waschvorgang, der die mit dem ungebundenen Enzym markierten Antikörper entfernt, wird das Konjugat durch Reaktion mit 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Säure gestoppt, um einen kolorimetrischen Endpunkt zu definieren der bei 450 nm spektrophotometrisch abgelesen wird.

20

Messung der Bindung von SAM-6 an oxLDL

Eine ELISA-Platte (Becton Dickinson Labware Europ, Frankreich) wurde mit den unterschiedlich stark oxidierten LDL Fraktionen über Nacht bei 4°C inkubiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit RPMI-1640 Medium welches mit 10% FCS versetzt wurde für 1h geblockt. Anschließend wurde die Platte mit 60µg/ml SAM-6 Antikörper für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die ELISA-Platte für 1 h mit HRP-gekoppeltem Zweitantikörper (rabbit anti human IgM, Dako, Hamburg, Deutschland, 1:1000 in PBS) inkubiert. Danach wurde die Platte nochmals mit PBS und Citratpuffer gewaschen, mit OPD (DakoCytomation, Glostrup,

30

Dänemark) versetzt und der Farbumschlag bei 490 nm mit einem ELISA-reader gemessen.

Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

5 Die verwendeten adhärenenten Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Reaktion wurde mit 10 ml RPMI-1640 Medium (+ Supplemente) abgestoppt und die Zellen mit 1000 x g für 5 min pelletiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in FACS-Puffer (PBS, 0,01% Na-Azid)

10 aufgenommen und zur Rekonstitution der Zellmembranen für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und je 200 µl der Zellsuspensionen in FACS-Reaktionsgefäße überführt, sodass pro Röhrchen eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen vorlag. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C

15 und 1400 rpm pelletiert, die Pellets resuspendiert und mit den Primär-Antikörpern für 15 min auf Eis inkubiert. Als Primär-Antikörper wurden 100 µg/ml SAM-6 Antikörper in FACS-Puffer (Gesamtvolumen 200 µl) bzw. 100mg/ml LDL verwendet. Als Isotyp-Kontrolle fungierten 100 µg/ml Chrompure human IgM. Alternativ wurden die Zellen mit LDL für 30 min vorinkubiert und anschließend für 15 min

20 100µg/ml SAM-6 Antikörper zugesetzt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen.

25 Danach erfolgte eine 15minütige lichtgeschützte Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Rabbit anti human IgM, FITC-gekoppelt, 1:50 in FACS-Puffer für SAM-6 bzw. Chrompure human IgM). Nach einem erneuten Waschgang wurden die Zellen in 200 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte mittels eines

30 Durchflußzytometers (FACScan; Becton Dickinson, USA).

Tierexperimente zum Nachweis der *in-vivo* Wirkung des Antikörpers SAM-6.10

5 **Experiment 1:** 500µg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intraperitoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 2 Tagen gemessen (Methode siehe unten).

Experiment 2: wie oben

10 **Experiment 3:** 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intraperitoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 14 Tagen gemessen.

15 Kontrolle A: Normalwerte Kontrollmaus
 Kontrolle B: Normalwerte Kontrollmaus

Die Serumkonzentration von LDL ist bei den mit SAM-6.10 behandelten Mäusen deutlich reduziert (siehe Figur 10 und 11).

20 Toxizität

500µg bzw. 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurde Mäusen intraperitoneal injiziert.

- keine akute Toxizität
- keine latente Toxizität (Zeitraum 3 Monate).

25

Die Organe der getöteten Mäuse aus Experiment 1, 2 und 3 (siehe oben) wurden entnommen und untersucht: Leber, Lunge, Herz, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Nieren, Magen und Gehirn wiesen keine morphologischen Veränderungen auf. Darüber hinaus wurden die Organe immunhistochemisch auf eventuelle Lipideinlagerungen unter-

30

sucht. Die Färbung mit Sudan III zeigte in keinem Organ eine Einlagerung von Lipiden.

5 Die Organe der getöteten Mäuse wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff Sudan III nach folgendem Protokoll:

10 Sudan III-Färbung auf Paraffinschnitten/ auf Makrophagen

Entparaffinierung:

- Xylol 1 5 min
- Xylol 2 5 min
- 15 • 100% Ethanol 1 5 min
- 100% Ethanol 2 5 min
- Methanol 70ml
+ H₂O₂ 500µl 5 min
- 90% Ethanol 1 3 min
- 90% Ethanol 2 3 min
- 20 • 80% Ethanol 1 3 min
- 80% Ethanol 2 3min
- 70% Ethanol 1 3 min
- 70% Ethanol 2 3 min
- 25 • Schnitte in PBS stellen
- Schnitte 15 min mit Sudan III inkubieren
- waschen mit Aqua dest.
- 1 x in 60% Isopropanol eintauchen
- waschen mit Aqua dest.
- 30 • Gegenfärbung mit Hämalaun für 6 min
- Schnitte 10 min wässern, waschen mit Aqua dest und mit Glyce-
ringelatine eindecken

35 Für die Sudan III Färbung von Makrophagen werden die adherenten Makrophagen auf Objektträgern angezüchtet und dann mit den entsprechenden Agenzien behandelt. Die Färbung wird wie folgt durchgeführt:

- Fixierung der Zellen in 60% Isopropanol (6 min)

- 20 min mit Sudan III inkubieren
- waschen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 6 min
- Schnitte 10 min wässern, waschen mit Aqua dest und mit Glyce-
ringelatine eindecken

Bestimmung von Lipiden in Blutproben

Die Messung der verschiedenen Lipide im Blutserum wurde automa-
tisch mit dem MODULAR D P800 Gerät (Roche) vorgenommen.

- 10 Die Bestimmung des LDL-Cholesterinwertes erfolgte durch eine en-
zymatische, kolorimetrische Methode (CHOD/PAP) ohne Probenvor-
behandlung.

Testprinzip zur Bestimmung der Lipidkonzentration im Serum:

- 15 HDL, VLDL und Chylomikronen werden von einem Detergenz 1 spe-
zifisch hydrolysiert. Das in diesen Lipoproteinen freigesetzte Choles-
terin reagiert sofort durch die enzymatische Wirkung der Cholesteri-
nesterase (CE) und Cholesterinoxidase (CHOD) und es entsteht
Wasserstoffperoxid. Dies bildet mit 4-Aminoantipyridin in Anwesen-
20 heit einer Peroxidase (POD) ein farbloses Produkt. Während dieses
Schrittes bleiben die LDL-Partikel intakt. Die Reaktion von LDL-
Cholesterin wird durch Zugabe von Detergenz 2 und der Kupplungs-
substanz N,N-bis(4-Sulfobutyl)-m-toluidin (DSBmT) ausgelöst. Das
25 zweite Detergenz setzt Cholesterin in den LDL-Partikeln frei. In der
enzymatischen Reaktion wird in Anwesenheit der Kupplungssub-
stanz ein Farbstoff gebildet. Die Intensität des gebildeten roten Chi-
noniminfarbstoffs ist direkt proportional zur LDL-Cholesterin-
Konzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei
30 552 nm bestimmt.

ELISA (LDL/HDL)

- ELISA-Platte vorbeschichten mit LDL (Lipoprotein Low Density from Human Plasma, Firma Sigma, 10µg/ml in PBS) oder HDL (Human HDL, Firma Chemicon, 10µg/ml in PBS) → 50 µl pro well
- 5 - Platte abdecken und über Nacht bei 4°C lagern
- am nächsten Tag Platte 2 x mit PBS waschen
- 100 µl RPMI in jedes well pipettieren. und für 1h bei RT inkubieren
- danach 2 x mit PBS waschen
- 10 - 50 µl der jeweiligen Positivkontrollen in je 2 wells pipettieren (Doppelbestimmung)
Positivkontrolle: Mab to human LDL Mouse IgG2a 1:1000 in PBS
- daneben 50 µl RPMI als Negativkontrolle (Doppelbestimmung)
- 50 µl der Proben (Überstand SAM6.10) (Doppelbestimmung) nebeneinander pipettieren
- 15 - 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 20 - 50 µl der jeweiligen 2. AK (Peroxidase konjugiert.) pipettieren:
rabbit anti human IgM 1:1000 in PBS/0,05% Tween (für SAM-6.10)
rabbit anti Mouse IgGs 1:1000 mit PBS Tween (für Positivkontrolle LDL)
- 25 - 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 1 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit Citratpuffer waschen
- 30 - zum Auswerten: OPD Tablette (Dako, Hamburg) in Citratpuffer lösen + H₂O₂ (3 ml Citratpuffer + eine Tabl. + 5 µl H₂O₂)
- 50 µl Farbstoff in jedes Well pipettieren
- bei positiver Reaktion (gelbe Färbung) mit 10 µl 3 M H₂SO₄ stoppen
- 35

Erläuterung der Figuren

Sequence listing

5 Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 1) der variablen Region der leichten Kette (V_L).

10 Figur 2 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 2) der variablen Region der leichten Kette (V_L). Die complementarity-determining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) von SEQ ID NO 2.

15 Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 3) der variablen Region der schweren Kette (V_H).

20 Figur 4 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 4) der variablen Region der schweren Kette (V_H). Die complementarity-determining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) und 295-330 (CDR3) von SEQ ID NO 4.

Zellbiologische Experimente

25 Die nachfolgende erklärten Figuren sollen die Erfindung nicht einschränken, sondern nur erläutern und deren Ausführbarkeit beispielhaft belegen.

30 Figur 5 zeigt die Messung von oxLDL in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit einer Kupfersulfatlösung. Im Versuch wurde LDL (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurde für 3 bzw. 15h mittels Inkubation mit 20 μ M CuSO₄ oxidiert. Mit dem Mercodia Oxidised LDL ELISA wurde, der Gebrauchsanweisung folgend, die Menge an oxi-

diertem LDL bestimmt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Menge an oxidiertem LDL mit steigender Inkubationsdauer zunimmt, wobei auch jene LDL Fraktion, welche nicht mit Kupferionen behandelt wurde, zum Teil schon in oxidierter Form vorliegt. Nach 15 stündiger Inkubation ist der Anteil an oxidiertem LDL etwa verdoppelt.

Figur 6 zeigt den Nachweis der Bindung von SAM-6 an oxLDL. Für den Nachweis der Bindung von SAM-6 an oxLDL mittels ELISA Bindungsassay wurden die ELISA Platte mit unterschiedlich stark oxidierten LDL Fraktionen vorbeschichtet, bevor der Erstantikörper SAM-6 und der zu Detektionszwecken erforderliche Zweitantikörper anti-human IgM hinzugegeben wurde. Das Ergebnis zeigt, dass je mehr LDL in seiner oxidierten Form vorliegt, desto stärker bindet der erfindungsgemäße Antikörper SAM-6.

Figur 7 zeigt das Ergebnis einer FACS Analyse. Bei den dafür verwendeten Zellen handelt es sich um Zellen der Maus-Makrophagen Zelllinie P388D1(IL-1) (DSMZ Accession No. ACC 288). Figur 7A zeigt die Bindung von LDL an Macrophagen. Figur 7B belegt, dass auch der humane monoklonale Antikörper SAM-6 an Macrophagen bindet. Mit dem Nachweis der Bindung eines Kontroll IgM an Macrophagen in Figur 7C wird gezeigt, dass die Macrophagen μ -Rezeptoren besitzen. Mit der Rechtsverschiebung des Signals in Figur 7D wird gezeigt, dass eine gleichzeitige Inkubation von LDL und SAM-6 eine vermehrte Bindung von SAM-6 an die Zellen bewirkt.

Die Figuren 8 und 9 zeigt das Ergebnis der Sudan III Färbung für die Zellen der Maus-Makrophagen Zelllinie P388D1(IL-1) verwendet wurden.

5 In Figur 8 sind Zellen gezeigt, die für 48h entweder mit SAM-6 oder einem IgM Kontrollantikörper inkubiert und anschließend einer Sudan III Färbung unterzogen wurden. Die mit dem Antikörper SAM-6 inkubierten Zellen zeigen aufgrund der Rotfärbung eine deutliche Einlagerung von Neutralfetten. Die mit dem Kontroll-Antikörper inkubierten Zellen zeigen dagegen keine Veränderungen.

10 Für die in Figur 9 zeigten Färbungen wurden die Makrophagen für 24h sowohl mit als auch ohne Zusatz von FCS kultiviert. Danach wurde für weitere 24h entweder nur LDL oder nur SAM-6 beziehungsweise LDL und SAM-6 gemeinsam zugesetzt. Anschließend wurde eine Sudan III Färbung durchgeführt. Die linke Bildspalte mit den Figuren 9A, 9C und 9E zeigen Zellen, die ohne den Zusatz von FCS kultiviert wurden. Die rechte Bildspalte mit den Figuren 9B, 9D und 9F zeigen Zellen, die mit Zusatz von FCS kultiviert wurden.

20 Die Figuren 9A und 9B belegen, dass sowohl Makrophagen, die ohne FCS kultiviert wurden, als auch Macrophagen, die in Anwesenheit von FCS gewachsen sind, eine basale Einlagerung von Neutralfetten zeigen. Die Figur 9C belegt, dass bei Zugabe von SAM-6 zu Makrophagen, die ohne FCS kultiviert wurden, keine Fett-Einlagerung nachweisbar ist. Dagegen wird, wie in Figur 9D gezeigt, eine verstärkte Lipid-Akkumulation bei Makrophagen beobachtet, die mit FCS kultiviert wurden und denen anschliessend SAM-6 zugesetzt wurde. Die Figuren 9E und 9F zeigen, dass bei einer Co-Inkubation von SAM-6 und LDL die intrazelluläre Lipid-Akkumulation sowohl bei Makrophagen, die mit FCS kultiviert wurden als auch bei denen die ohne Zusatz von FCS gewachsen sind, deutlich zu nimmt.

30 Figur 10 zeigt den Einfluss des Antikörpers SAM-6 auf LDL Werte *in vivo*. Im Versuch wurde den Mäusen 1mg gereinigter SAM-6 Antikörper

per bzw. im Kontrollexperiment 1mg human Chrompure IgM (Isotyp-Kontrolle) i.p. injiziert. Die LDL Konzentration im Blut wurde nach 24 und 48h gemessen. Dabei kann nach 24 und 48h Stunden bei SAM-6 behandelten Mäusen eine deutliche Reduktion von Serum LDL beobachtet werden.

Die Messung von LDL im Blutserum wurde automatisch mit dem MODULAR D P800 Gerät (Roche) vorgenommen, wobei sich die aufgetragenen Werte als Ergebnis des Diagnostik Kits „LDL-Cholesterol Direct“ (Firma Roche Diagnostiks) ergeben.

Figur 11 weist ebenfalls die *in vivo* Wirkung von SAM-6.10 nach, wobei zur Errechnung der Werte eine indirekte Methode nach der Friedewald-Formel angewandt wurde. Dabei errechnet sich die Menge an LDL aus der Differenz von Gesamtcholesterin, HDL und Triglyceriden. Gemäß dieser Art der Versuchsauswertung wäre die Reduktion der Konzentration von LDL im Serum nach SAM-6.10 Behandlung noch stärker.. Diese indirekte Meßmethode muss jedoch im Vergleich zu der in Figur 10 angewandten Methode als ungenauer angesehen werden.

Patentansprüche

- 5
1. Gereinigtes Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- die Aminosäuresequenz des Polypeptids im wesentlichen i-
 - dentisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1
 - und/oder SEQ ID NO:3, und
 - das Polypeptid low density lipoproteins (LDL) und/oder oxi-
 - diertes LDL (oxLDL), insbesondere LDL-Cholesterin und/oder
 - 10 oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin), bindet.
- 15
2. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekenn-**
zeichnet, dass die Bindung des Polypeptides oder der Fragmen-
- te des Polypeptids an low density lipoproteins (LDL) und very low
density lipoproteins (VLDL), bzw. die jeweils oxidierte Form
(oxLDL und (oxVLDL), stärker ist als die Bindung an high density
lipoproteins (HDL).
- 20
3. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch**
gekennzeichnet, dass das Polypeptid oder Fragmente des Poly-
- peptids und die im menschlichen und tierischen Körper vorkom-
- menden low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidierten low
- 25 density lipoproteins (oxLDL) komplementäre Carbohydrat-
- Strukturen aufweisen.
- 30
4. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprü-
- che, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein Antikör-
- per oder ein funktionelles Fragment davon ist.

5. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein funktionelles Fragment einer der nachfolgend genannten Gruppen von V_L , V_H , F_V , F_C , F_{ab} , F_{ab}' , und $F(ab')_2$ ist.

5

6. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aminosäuresequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 1 und/oder die Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 3.

10

7. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 2 und/oder die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 4.

15

20

8. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die genannten Fragmente ein Fragment der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO 1 oder der SEQ ID NO 3 beinhalten.

25

30

- 5
9. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die genannten Fragmente ein Sequenzfragment enthalten, das im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3.
- 10
10. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1.
- 15
11. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 3.
- 20
12. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) of SEQ ID NO 2.
- 25
13. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) and 295-330 (CDR3) of SEQ ID NO 4.
- 30

14. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 beinhaltet.
- 5 15. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 beinhaltet.
- 10 16. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3 beinhaltet.
- 15 17. Complementarity-determining regions (CDR) oder funktionelle Fragmente davon, welche die Aminosäuresequenzen Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1) oder Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) oder Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) of SEQ ID NO: 1 und/oder Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1) oder Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) oder Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) SEQ ID NO: 3 umfassen.
- 20
- 25 18. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid nach dem in Anspruch 19 beanspruchten Verfahren generierbar ist.
- 30 19. Verfahren zur Generierung eines Antikörpers nach der Hybridomtechnik, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hybridom-Zellen durch Fusion der Heteromyelom-Zellen HAB-1 sowie deren Sub-

klone mit B-Lymphozyten gewonnen werden, welche aus humanen Milzen, Lymphknoten oder Blut entnommen sind.

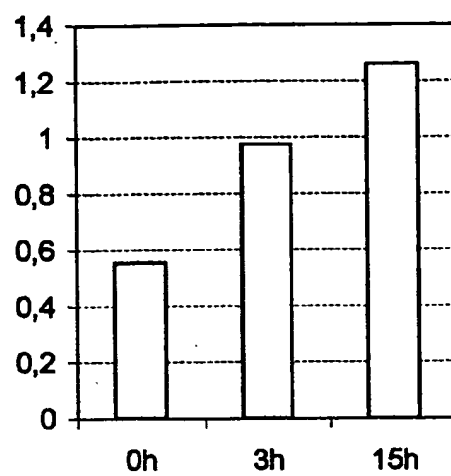
- 5 20. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1, 17 und 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein monoklonaler Antikörper ist.
- 10 21. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein humaner monoklonaler Antikörper ist.
- 15 22. Verwendung eines Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fettsenkender Wirkung.
- 20 23. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von low density lipoproteins (LDL) und/oder oxidiertem LDL (oxLDL) im Blut.
- 25 24. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von LDL-Cholesterin und/oder oxidiertem LDL-Cholesterin (oxLDL-Cholesterin).

30

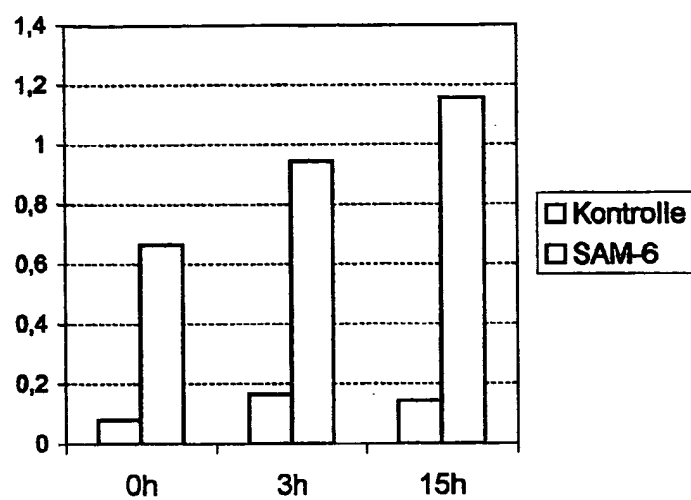
25. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Nierenerkrankungen.

5

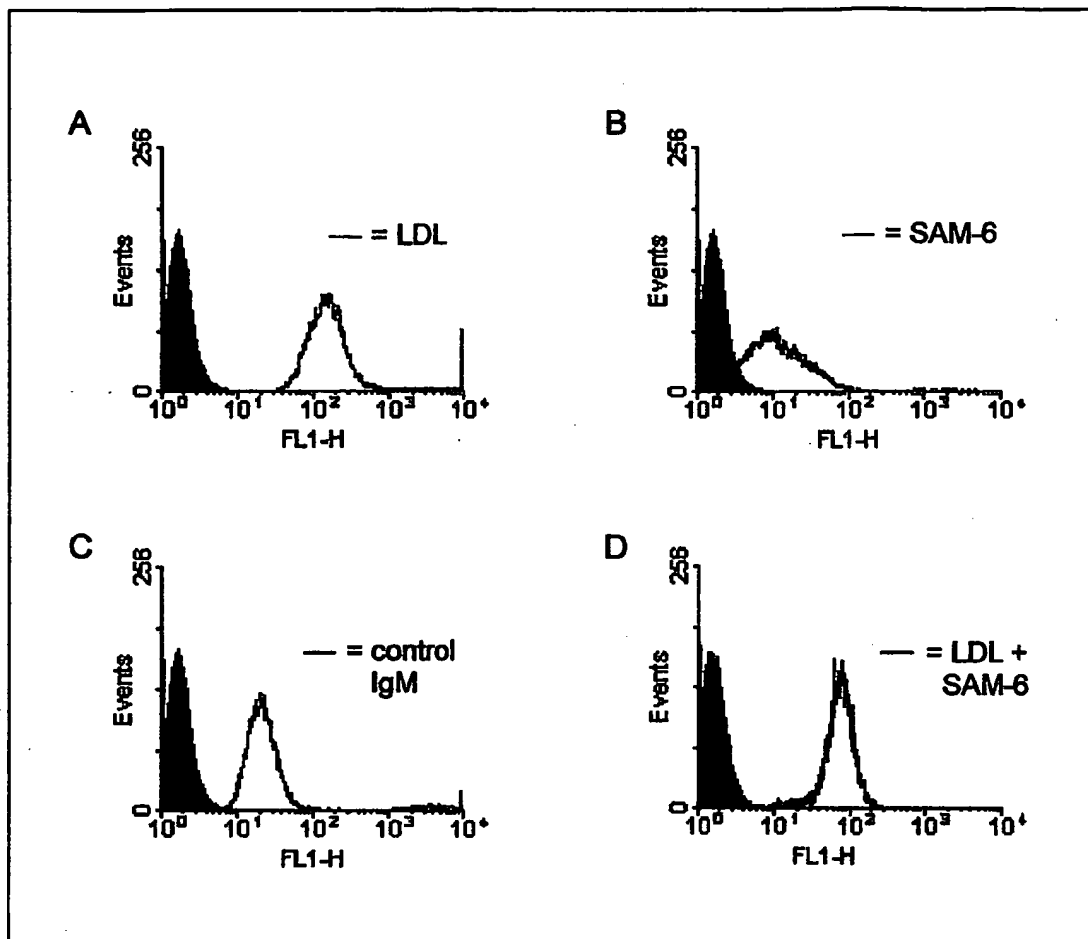
26. Verwendung des Polypeptids nach Ansprüche 25 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Glomerulonekrose.



Figur 1



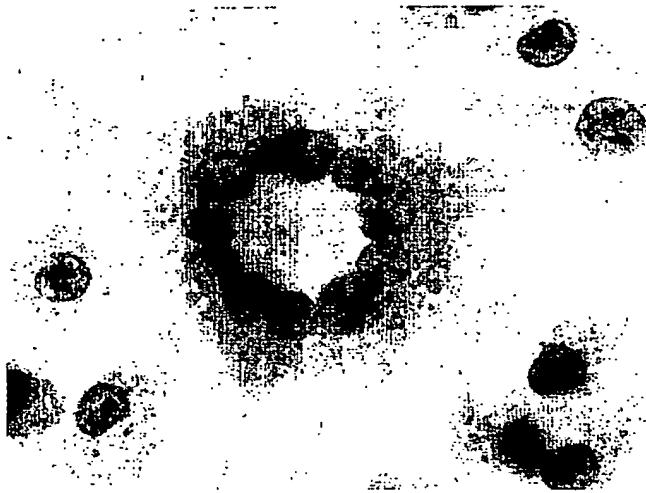
Figur 2



Figur 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

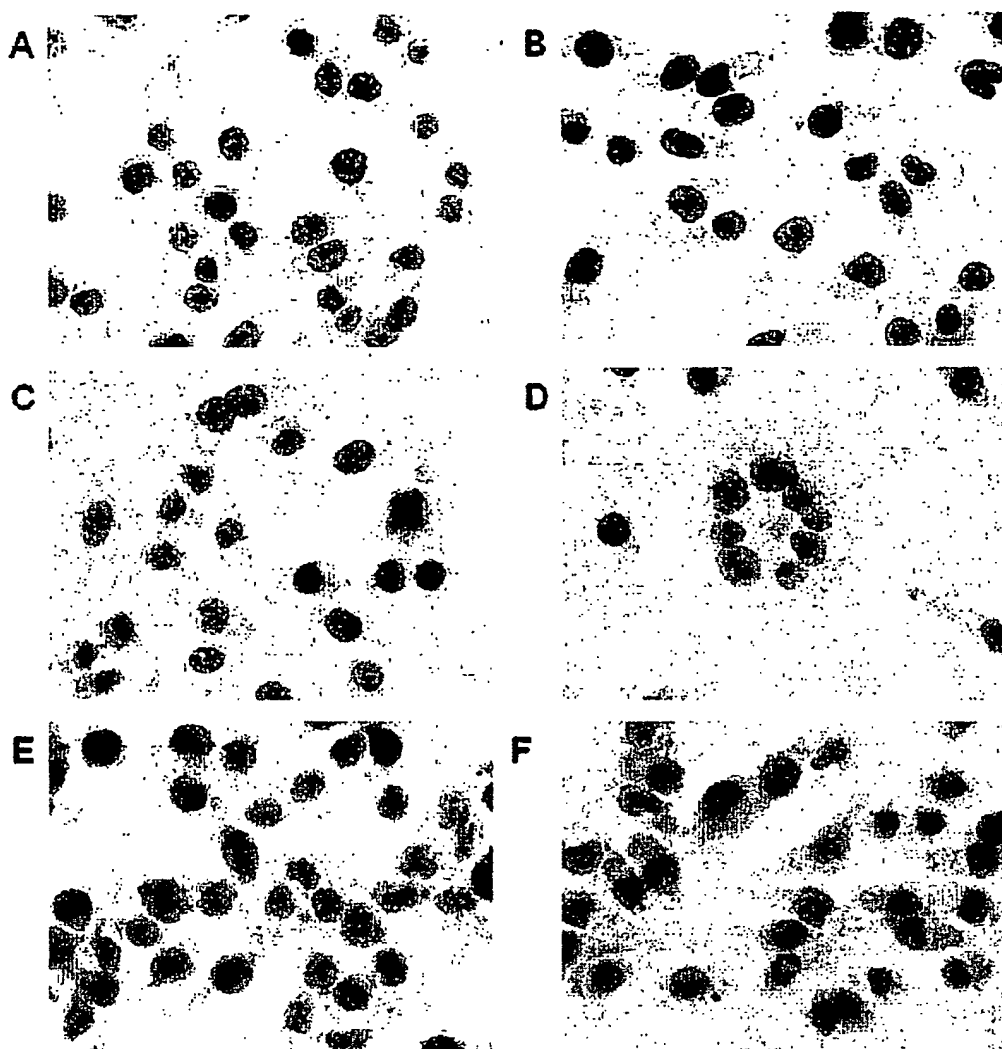
BEST AVAILABLE COPY



Figur 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

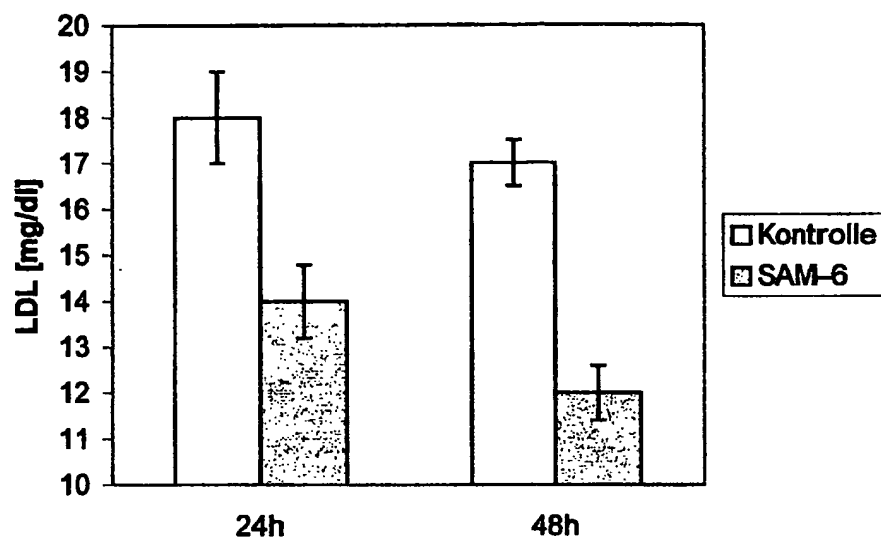
BEST AVAILABLE COPY



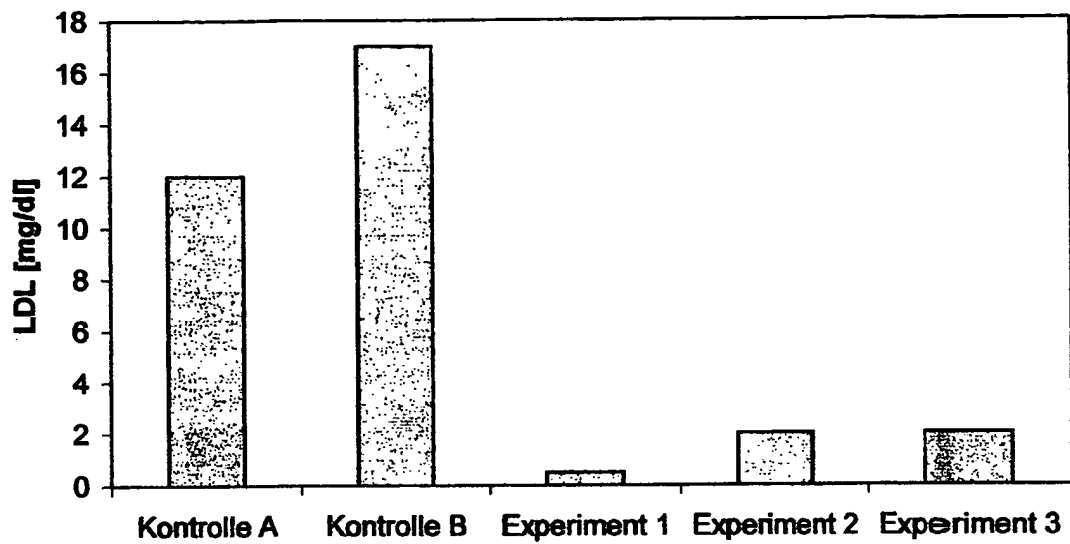
Figur 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY



Figur 6



Figur 7

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

Sequence listing

<110> Vollmers, Philip

<120> Human monoclonal antibody

<150> DE-10 353 175.0

<151> 2003-11-14

<160> 4

<210> 1

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Amino acid sequence of the variable region of the light chain (V_L) of antibody SAM-6

<400> 1

Ser	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5				10						15

Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys
				20				25						30

Tyr	Ala	Cys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu
				35				40						45

Val	Ile	Tyr	Gln	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg
				50				55						60

Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
				65				70						75

Gly	Thr	Gln	Ala	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp
				80				85						90

Asp	Ser	Ser	Ile	Val	Val
				95	

<210> 2

<211> 288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Nucleotide sequence of the variable region of the light chain (V_L) of antibody SAM-6

<400> 2

tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca gga	45
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
CDR1	
cag aca gcc agc atc acc tgc tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa	90
Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys	
20 25 30	
tat gct tgc tgg tat cag cag aag cca ggc cag tcc cct gtg ctg	135
Tyr Ala Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu	
35 40 45	
CDR2	
gtc atc tat caa gat agc aag cgg ccc tca ggg atc cct gag cga	180
Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg	
50 55 60	
ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc agc	225
Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
ggg acc cag gct atg gat gag gct gac tat tac tgt cag gcg tgg	270
Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp	
80 85 90	
CDR3	
gac agc agc att gtg gta	288
Asp Ser Ser Ile Val Val	
95	

<210> 3

<211> 110

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Amino acid sequence of the variable region of the heavy chain (V_H) of antibody SAM-6

<400> 3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15

Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20					25					30

Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35				40						45

Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr
				50					55					60

Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65					70					75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Gly
				95					100					105

Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr
				110

<210> 4

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Nucleotide sequence of the variable region of the heavy chain (V_H) of antibody SAM-6

<400> 4

cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	45
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	

agg	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	90
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
				20					25					30	

CDR1

agc	tat	gct	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	135
Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	

CDR2

gag	tgg	gtg	gca	gtt	ata	tca	tat	gat	gga	agc	aat	aaa	tac	tac	180
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	
				50					55					60	

gca	gac	tcc	gtg	aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	225
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	
				65					70					75	

aag	aac	acg	ctg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gct	gag	gac	270
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	

CDR3

acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	gat	cgg	tta	gca	gtg	gct	ggt	315
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	
				95					100					105	

aaa	act	ttt	gac	tac											
Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr											
					110										